

AUS DEN WISSENSCHAFTLICHEN LABORATORIEN DER
CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, BASEL, PHARMAZEUTISCHE ABTEILUNG

BEEINFLUSSUNG DER NEBENNIERENRINDENSEKRETION DURCH POLYPEPTIDE *IN VITRO*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Heilkunde der
Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Elfriede Maria GRÖGER-KORBER

von Wien/Oesterreich

1965

Gent, 1966

VON DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT BASEL GENEHMIGT AUF ANTRAG VON
HERRN PROFESSOR DR. MED. H. J. BEIN

Tag der Promotion : 26. Januar 1965



Erschienen in „Archives internationales de Pharmacodynamie et de
Thérapie”, Vol. 163 (1966), Fasc. 1, p. 158-173.

AUS DEN FORSCHUNGLABORATORIEN DER CIBA AKTIENGESELLSCHAFT
PHARMAZEUTISCHE ABTEILUNG, BASEL, SCHWEIZ

BEEINFLUSSUNG DER NEBENNIERENRINDENSEKRETION DURCH POLYPEPTIDE *IN VITRO*

VON

E. M. GRÖGER-KORBER

(Eingegangen am 15-10-1965).

Bestimmte Peptidhormone beeinflussen die Steroidsekretion der Nebennierenrinde (NNR). Von diesen ist das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) seit langem bekannt. Es erhöht vorwiegend die Glukocorticoidsekretion der NNR, übt jedoch einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Mineralocorticoidabgabe aus (20, 33).

Die von verschiedenen Tierarten unter der Einwirkung von ACTH secernierten Glukocorticoide können unter sonst gleichen Bedingungen verschieden sein. So findet man im NN-Venenblut von Ratte und Kaninchen mehr als 20mal soviel Corticosteron als Cortisol, während bei Schaf und Affe das entsprechende Verhältnis umgekehrt ist und bei Hund und Katze ca. 6mal mehr Cortisol als Corticosteron secerniert wird (6).

Die Wirkung von ACTH bzw. die ACTH-ähnliche Wirkung einer Substanz kann mittels *in vivo*- oder *in vitro*-Methoden erfasst werden. *In vivo* wird die Testsubstanz hypophysektomierten Hunden oder Ratten verabreicht und der Anstieg der Steroidkonzentration im NN-Venenblut nachgewiesen. Bei einem häufig angewandten *in vitro*-Test wird die zu prüfende Substanz dem Inkubationsmedium geviertelter Ratten-Nebennieren zugesetzt und hierauf die Steroidkonzentration im Inkubationsmedium bestimmt (21, 22, 13).

Die Sekretion von Aldosteron, dem Hauptvertreter der Mineralocorticoide, wird wahrscheinlich sowohl direkt über Änderungen des Elektrolytgehaltes des Plasmas und eventuell auch des Gewebes als auch indirekt über Angiotensin gesteuert (7). Die Regulierung der Aldosteronsekretion, z. B. durch Angiotensin II, scheint aber von Species

zu Species verschieden zu sein. *In vivo* konnte wohl beim Hund (8), nicht aber bei der Ratte (11) durch Infusion von Angiotensin II die Aldosteronabgabe der NNR angeregt werden. Auch *in vitro*-Versuche führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. An Rinder-NNR-Schnitten konnte nach Zusatz von Cholesterin eine Steigerung der Aldosteronsekretion durch Angiotensin II nachgewiesen werden (15). An Ratten- und Hühner-NN konnte — allerdings ohne Cholesterinzusatz — keine entsprechende Steigerung festgestellt werden (12, 10, 19). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass ein Fehlen des Effekts von Angiotensin II durch enzymatischen Abbau desselben bedingt sein könnte; Angiotensin II ist in Peptidase-haltigen Medien nur sehr kurzlebig (3).

Will man von ACTH verschiedene Peptide, z. B. Teilstücke von ACTH oder Angiotensin II auf ihre Wirkung auf die NNR untersuchen, so bieten sich die beiden vorerwähnten Nachweismethoden an. Beide Methoden versprechen nach den Angaben der Literatur eine ACTH-ähnliche Wirkung relativ gut zu erfassen. In der vorliegenden Untersuchung wurde der *in vitro*-Test von SAFFRAN und SCHALLY (22) angewandt. Hiermit sollte versucht werden, die folgenden Fragen abzuklären:

1. Welche Aminosäuresequenz von ACTH-Teilstücken übt noch eine ACTH-Wirkung aus? Bekannt ist, dass ein synthetisches 23-iger-Peptid noch die volle ACTH-Wirkung aufweist (14). Ausser reinen Teilstücken von ACTH (1-10er und 11-24er-Sequenz) wurden für die vorliegende Untersuchung auch das die ACTH-Sequenz 1-13 bzw. 4-10 enthaltende Alpha- und Beta-MSH herangezogen.

2. Reagieren im *in vitro*-System Nebennieren hypophysektomierter Ratten schlechter auf ACTH als solche normaler Tiere? Aus klinischen und experimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass längere Zeit inaktive NN auf einmalige ACTH-Injektion kaum ansprechen und deshalb zur Unterscheidung primärer von sekundärer NNR-Insuffizienz mehrmalige ACTH-Gaben erforderlich sind (32, 9).

3. Wie rasch wird Angiotensin unter den Bedingungen des Saffran-Tests enzymatisch abgebaut?

4. Kann durch Konstanthalten der Angiotensinkonzentration im Inkubationsmedium, bei An- oder Abwesenheit von Cholesterin, eine erhöhte Aldosteronsekretion der NNR nachgewiesen werden?

METHODIK

In vitro-Inkubation nach Saffran und Schally. Acht 200-250 g schwere, männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden mit Pentobarbital (50 mg/kg s.c.) narkotisiert und

jeweils zur gleichen Tageszeit (9⁰⁰ Uhr) decapitiert. Ihre Nebennieren wurden inner 10 Minuten freipräpariert und geviertelt. Die Viertel wurden sofort auf 16, je 2 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer enthaltende, silikonisierte Erlenmeyer-Kölbchen so verteilt, dass jedes Kölbchen vier von verschiedenen Tieren stammende Nebennierenviertel enthielt. Die Kölbchen wurden hierauf 5 Minuten mit O₂/CO₂ (95 : 5) durchströmt und 1 Stunde im Wasserbad bei 37° C geschüttelt (Vorinkubation). Das Vorinkubat wurde verworfen und durch je 1,5 ml frischen Bicarbonatpuffer ersetzt. 4 Kölbchen dienten als Kontrolle (Puffer ohne Zusatz), 6 Kölbchen enthielten im Puffer ACTH in 3 verschiedenen Konzentrationen und die restlichen 6 die Testsubstanz in 3 Konzentrationen mit ähnlicher Wirkungsintensität. Nach neuerlichem Durchströmen mit O₂/CO₂ (5 Minuten) wurden die Kölbchen 2 Stunden bei 37° C geschüttelt (Hauptinkubation). Nach Absaugen des Hauptinkubats wurden die Nebennierenviertel feucht gewogen; pro Kölbchen betrug ihr Gewicht im Durchschnitt 30 ± 5 mg.

In einigen Versuchsreihen wurden auch Nebennieren von Ratten verwendet, die 96 Stunden vor Versuchsbeginn nach der Methode von Selye in der Modifikation von Bülbiring hypophysektomiert wurden (4).

Steroidbestimmung nach Zaffaroni und Bush. Das Hauptinkubat von je 2 Kölbchen gleicher Konzentration einer Substanz wurde in einen Schütteltrichter geleert und jedes Kölbchen mit 2 ml Bicarbonatpuffer und 7,5 ml Methanol nachgespült. Die je 12,5 ml wässrige Phase (an Methanol 60 %-ig) wurden 3mal mit 12 ml Hexan entfettet, 3mal mit 6 ml Chloroform extrahiert und der Chloroformextrakt im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit insgesamt ca. 3 ml Aceton in 5 ml-Röhrchen gespült, das Aceton unter Stickstoff abgedampft und die verbliebene Substanz in 30 μ l Propanol gelöst. In der erhaltenen Lösung wurden Aldosteron und Corticosteron auf papierchromatographischem Wege mittels dreier Nachweismethoden und einer Genauigkeit von ± 20 % bestimmt. Die chromatographische Trennung und die Auswertung der Chromatogramme wurde im zentralen Chromatographielabor der CIBA A.G. durchgeführt. (1).

Bestimmung des Angiotensin II-Abbaus im Inkubationsmedium. Die Ansätze wurden wie für die „In vitro Inkubation“ beschrieben vorbereitet. Nach dem Abgiessen des Vorinkubats wurde den 16 Kölbchen je 1,5 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 0,1, 1,0 und 10,0 γ /ml Angiotensin II zugefügt. Hierauf wurde 5 Minuten O₂/CO₂ eingepertlt und der Inhalt von je 2 Kölbchen vereinigt. Zwei der erhaltenen 8 Proben dienten als Kontrollen und wurden sofort im siedenden Wasserbad 5 Minuten erhitzt, um den enzymatischen Abbau zu beenden. Die übrigen Proben wurden bei 37° C geschüttelt und je 2 davon nach 10, 30 und 60 Minuten ebenfalls 5 Minuten erhitzt. Nach Abkühlen auf 0° C wurden die Proben zentrifugiert (2500 U/Min.) und im Ueberstehenden die pressorische Aktivität am Blutdruck der nephrektomierten Ratte bestimmt (Urethannarkose, 1,4 g/kg s.c.). Als Vergleich dienten Standarddosen, die ohne Inkubation sofort erhitzt wurden; ihr Angiotensingehalt wurde mit 100 % festgesetzt. Appliziert wurden jeweils 0,1 ml (pro Ratte) der für den Messbereich (10–40 mm Hg Blutdrucksteigerung) entsprechend verdünnten Lösungen. Die Standarddosen waren 0,01, 0,02 und 0,04 γ Angiotensin II pro Ratte (3).

Zur Erhaltung einer annähernd konstanten Konzentration an Angiotensin II im Inkubationsmedium wurde diesem alle 20 Minuten 50 % des ursprünglich vorhandenen Angiotensins, gelöst in 0,1 ml Bicarbonatpuffer, zugesetzt. Um die Konzentrationskonstanz nachzuprüfen, wurden die Ansätze nach je 20, 40, 60, 80, 100 und 120 Minuten

(1) Herrn Dr. R. NEHER sei an dieser Stelle für die Auswertung der Chromatogramme herzlich gedankt.

im Wasserbad erhitzt und die Angiotensinkonzentration davon wie unter C angegeben am Blutdruck der Ratte ermittelt.

Die *in vitro*-Wirkung von Angiotensin II wurde in einigen Versuchsreihen, unter sonst unveränderten Bedingungen, auch in Inkubationsmedien festgestellt, die 1,3 bzw. 13,3 γ Cholesterin pro ml enthielten (15).

Ueber die verwendeten Testsubstanzen orientiert Tabelle I.

Die Streuung der Mittelwerte und die Signifikanz wurde mit den Lord'schen Zahlen (18) ermittelt.

TABELLE I

Substanzen	Angewandte Konzentrationen in γ /ml Bicarbonatpuffer
1. Natürliches ACTH (β -Corticotropin) ein an Oxytel hochgereinigter Extrakt aus Schweinehypophysen mit einer Aktivität von 90–100 E/mg (gemessen im Sayers-Test nach US-Pharmacopoea XVI, 177) (Fa. WILSON, Chicago)	0,017, 0,033 0,067, 0,100 und 0,330
2. Synthetisches β^{1-24} -Corticotropin (24)	0,017, 0,033 0,067 und 0,200
3. Synthetisches β^{1-10} -Corticotropin (23)	1,67, 3,33 und 6,67
4. Synthetisches β^{11-24} -Corticotropin (16)	0,033, 1,67 3,33 und 6,67
5. Synthetisches α -MSH (Schwein) (25)	3,33 10,0 33,3 und 66,7
6. Synthetisches β -MSH (Rind) (27)	1,67, 3,33 und 6,67
7. Synthetisches L - α -Asp = $(NH_2)^1$, Val ⁵ -Angiotensin II (26)	0,1, 1,0 und 10,0
8. Synthetisches Bradykinin (2)	0,02, 0,2 und 2,0

ERGEBNISSE

Corticotrope Wirkung von ACTH und seinen Bruchstücken. Die von den Ratten-Nebennierenquarteln innert 2 Stunden an das Inkubationsmedium abgegebene Corticosteronmenge und auch die Aldosteronmenge steigen unter der Einwirkung von natürlichem ACTH annähernd linear mit dem Logarithmus der ACTH-Konzentration an (ABB. 1a und TAB. II). Es wurde somit eine signifikante ($p < 0,05$) wenn auch sehr geringfügige Steigerung der Aldosteronsekretion gefunden. Die Aktivität des synthetischen β^{1-24} -Corticotropins entspricht bezüglich der Förderung der Corticosteronsekretion derjenigen des natürlichen ACTH (ABB. 1b und TAB. II). Die Beeinflussung der Aldosteron-Sekretion

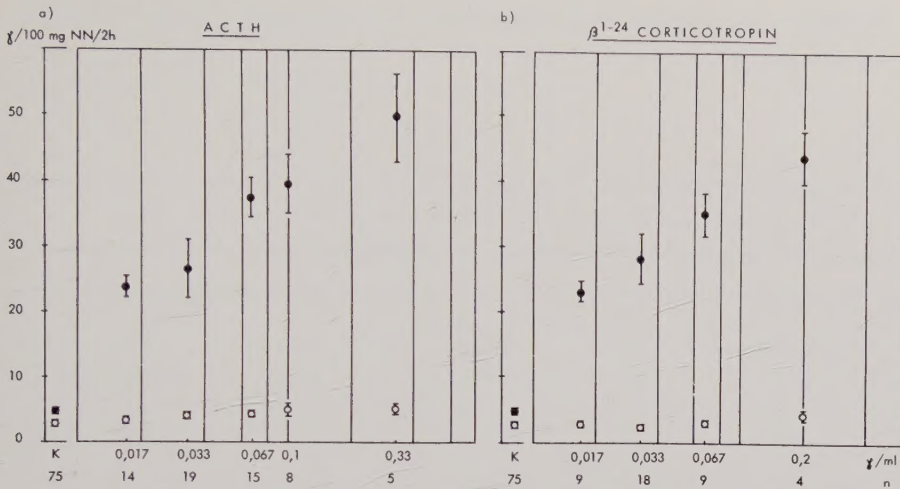


ABB. 1

Wirkung von natürlichem ACTH (a) und synthetischem β^{1-24} -Corticotropin (b) auf die Corticosteron- und Aldosteronsekretion von Ratten-Nebennieren *in vitro*.

Abszisse: log-Dosis der ACTH-Konzentration im Inkubationsmedium.

Ordinate: γ freigesetztes Steroid pro 100 mg NN innert 2 Stunden.

K = Kontrollwert, n = Anzahl der Versuche, ● = Corticosteron, ○ = Aldosteron.

TABELLE II

Wirkung von natürlichem ACTH und β^{1-24} -Corticotropin auf Ratten-Nebennieren

Konzentration γ/ml	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h, ACTH}$		n	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h, } \beta^{1-24}\text{-C}$		n
	Cortico- steron	Aldo- steron		Cortico- steron	Aldo- steron	
0,017	$23,7 \pm 1,8$	$3,2 \pm 0,4$	14	$23,6 \pm 1,5$	$2,7 \pm 0,4$	9
0,033	$26,6 \pm 4,4$	$3,9 \pm 0,4$	19	$28,5 \pm 3,9$	$2,2 \pm 0,3$	18
0,067	$37,4 \pm 3,0$	$4,2 \pm 0,5$	15	$35,4 \pm 3,3$	$3,2 \pm 0,4$	9
0,1	$39,4 \pm 4,6$	$4,9 \pm 0,8$	8			
0,2				$44,0 \pm 4,2$	$4,4 \pm 0,7$	4
0,33	$49,6 \pm 6,9$	$5,0 \pm 0,8$	5			
Kontrollwerte	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75

wurde nur bis zu einer Konzentration von 0,2 γ/ml ACTH 1-24 geprüft; eine signifikante Abweichung vom Kontrollwert wurde nicht gefunden.

Die Teilsequenzen 1-10 (Dekapeptid) und 11-24 (Tetradekapeptid) von ACTH erweisen sich in dem Konzentrationsbereich, in dem ACTH und β^{1-24} -Corticotropin bereits eine deutliche Corticosteronsekretion bewirken, als inaktiv (TAB. III). Die bei der Konzentration von 6,67 γ/ml

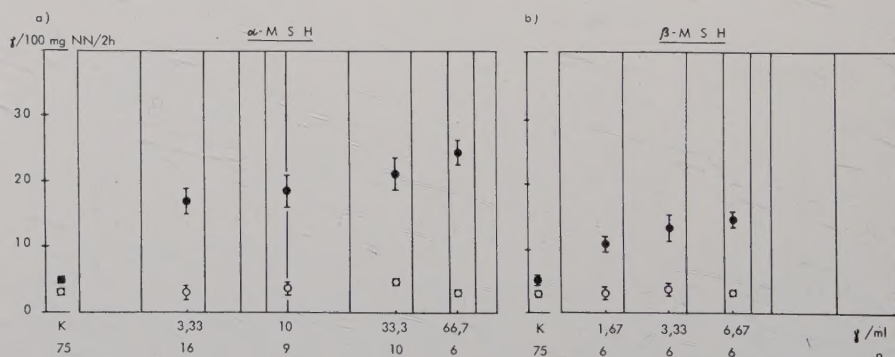
erzielte geringfügige Steigerung der Corticosteronsekretion ist nicht signifikant ($p > 0,1$).

TABELLE III

Wirkung der synthetischen ACTH-Bruchstücke β^{1-10} - und β^{11-24} -Corticotropin auf Ratten-Nebennieren

Konzentration γ/ml	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h, } \beta^{1-10}\text{-C}$		n	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h, } \beta^{11-24}\text{-C}$		n
	Cortico- steron	Aldo- steron		Cortico- steron	Aldo- steron	
0,33				$5,8 \pm 1,6$	$4,6 \pm 0,8$	3
1,67	$4,8 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,7$	3	4,6	3,0	1
3,33	$5,7 \pm 1,4$	$3,7 \pm 0,3$	3	5,0	4,2	1
6,67	$7,8 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,6$	3	6,3	4,2	1
Kontrollwerte	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75

Corticotrope Wirkung von Peptiden, die einen Teil der ACTH-Sequenz enthalten. Sowohl α -MSH als auch β -MSH bewirken im Saffran-Test eine Erhöhung der Corticosteron-Ausscheidung, die allerdings durch Steigerung der Dosis nicht wesentlich erhöht werden kann. Die ebenfalls bestimmten Aldosteronmengen unterscheiden sich nicht signifikant vom Kontrollwert (ABB. 2a und b, TAB. IV).



AB.2

Wirkung von α -MSH (a) und β -MSH (b) auf die Corticosteron- und Aldosteronsekretion von Ratten-Nebennieren (Legende siehe ABB. 1).

In weiteren Versuchen sollte die Frage abgeklärt werden, ob sich die Wirkungen von β^{1-24} -Corticotropin und α -MSH addieren. Die Mischung von $0,033 \gamma \beta^{1-24}$ -Corticotropin und $3,33 \gamma \alpha$ -MSH pro ml

Bicarbonatpuffer ergab keine Addition der Wirkungen (TAB. V). Zum Vergleich sind in Tab. V auch die entsprechenden Werte für die Einzelsubstanzen (aus TAB II und IV) angegeben.

TABELLE IV

Wirkung von α -MSH und β -MSH auf die Corticosteron- und Aldosteron-Sekretion von Ratten-Nebennieren

Konzentration γ /ml	γ /100 mg NN/2 h, α -MSH		n	γ /100 mg NN/2 h, β -MSH		n
	Cortico- steron	Aldo- steron		Cortico- steron	Aldo- steron	
1,67				$10,8 \pm 1,3$	$3,3 \pm 0,7$	6
3,33	$17,1 \pm 2,1$	$3,1 \pm 1,0$	16	$13,3 \pm 1,6$	$3,6 \pm 0,7$	6
6,67				$14,0 \pm 1,2$	$3,2 \pm 0,1$	6
10,0	$18,4 \pm 2,7$	$3,8 \pm 0,7$	9			
33,3	$21,2 \pm 2,7$	$4,3 \pm 0,7$	10			
66,7	$24,5 \pm 1,8$	$2,8 \pm 0,2$	6			
Kontrollwerte	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75

Veränderung der NNR-Funktion durch Hypophysektomie. 96 Stunden nach Hypophysektomie sinken die Kontrollwerte für Corticosteron und Aldosteron auf ca. 50 % des Normalwertes ab. Wird die NNR mit β^{1-24} -Corticotropin stimuliert, so resultiert eine wesentlich geringere Anregung der Corticosteronsekretion als bei NN-Vierteln normaler Ratten (ABB. 3 und TAB. VI).

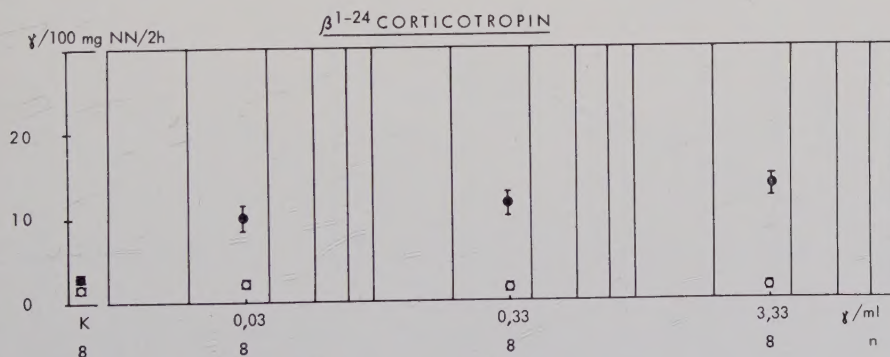


ABB. 3

Stimulierung von Ratten-Nebennieren, 96 Stunden nach Hypophysektomie durch β^{1-24} -Corticotropin (Legende wie ABB. 1).

TABELLE V

Wirkung eines Gemisches von α -MSH und β^1 - 24 -Corticotropin auf Ratten-Nebennieren

Konzentration γ/ml	α -MSH + β^1 - 24 -Cort.		n	α -MSH		n	β^1 - 24 -Cort.		n
	Cortico- steron *	Aldo- steron *		Cortico- steron *	Aldo- steron *		Cortico- steron *	Aldo- steron *	
0,03	24,0 $\pm$ 3,1	2,7 $\pm$ 0,1	8	—	—	—	28,5 $\pm$ 3,9	2,2 $\pm$ 0,3	18
3,33				17,1 $\pm$ 2,1	3,1 $\pm$ 1,0	16	—	—	—
Kontrollwerte	5,1 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,3	75	5,1 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,3	75	5,1 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,3	75

* $\gamma/100$ mg NN/2 h.

TABELLE VI

*Stimulierung von Ratten-Nebennieren, 96 Stunden nach
Hypophysektomie durch β^{1-24} -Corticotropin*

Konzentration γ/ml	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h, } \beta^{1-24}\text{-Corticotropin}$		n
	Corticosteron	Aldosteron	
0,033	$9,9 \pm 1,5$	$2,0 \pm 0,3$	8
0,33	$11,4 \pm 1,5$	$1,5 \pm 0,3$	8
3,33	$13,5 \pm 1,4$	$1,5 \pm 0,2$	8
Kontrollwerte	$2,8 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,1$	8

Versuche mit Angiotensin II. Die pressorische Aktivität von Angiotensin II ($0,1-10,0 \gamma/\text{ml}$) in Krebs-Ringerlösung nimmt in Gegenwart von Ratten-Nebennierenvierteln stetig ab. Die ursprüngliche Angiotensinkonzentration von $1,0 \gamma/\text{ml}$ sinkt nämlich nach 30 Minuten Inkubation auf 48 %, nach 60 Minuten auf 30 % und nach 120 Minuten auf 11 % des Ausgangswertes ab (ABB. 4).

Wird dem Inkubationsmedium alle 20 Minuten 50 % der ursprünglich vorhandenen Angiotensinmenge ($1,0 \gamma/\text{ml}$) zugesetzt, so lässt sich

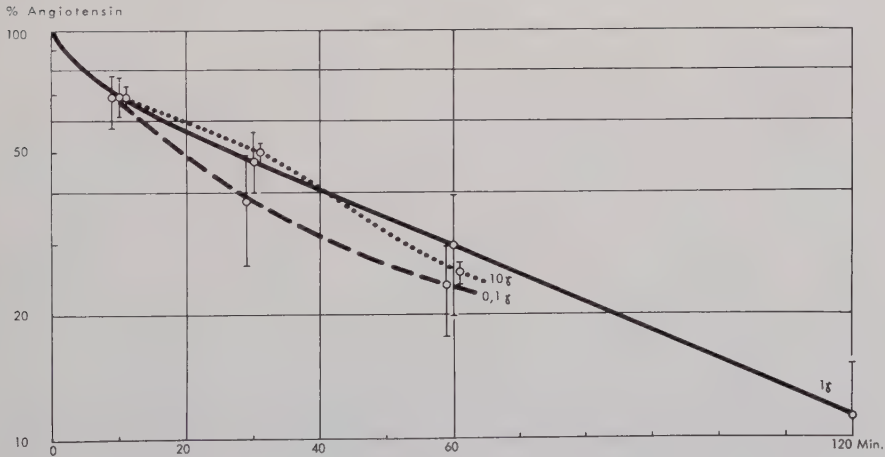


ABB. 4

Bestimmung der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit von Angiotensin II im Inkubationsmedium. Die zu Beginn der Inkubation zugesetzte Menge von Angiotensin II ist jeweils gleich 100 % gesetzt.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Angiotensin in %.

TABELLE VII

Stimulierung der Ratten-Nebennieren durch Angiotensin II, wobei alle 20 Minuten 50 % der ursprünglichen Menge zugesetzt wurde

Konzentration γ/ml	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h}$ ohne Cholesterin		n	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h}$ + 1,3 γ Cholest.		n	$\gamma/100 \text{ mg NN}/2 \text{ h}$ + 13,3 γ Cholest.		n
	Cortico- steron	Aldo- steron		Cortico- steron	Aldo- steron		Cortico- steron	Aldo- steron	
0,1	$4,3 \pm 0,9$	$3,0 \pm 0,3$	4	$4,0 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,5$	3	$7,6 \pm 0,7$	$3,1 \pm 0,4$	7
1,0	$5,9 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,6$	4	$4,3 \pm 1,0$	$3,7 \pm 0,5$	3	$7,8 \pm 0,8$	$3,8 \pm 0,4$	7
10	$5,7 \pm 0,8$	$3,7 \pm 0,8$	4	$5,8 \pm 1,1$	$5,3 \pm 1,2$	3	$7,8 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	7
Kontrollwerte	$5,1 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	75	$4,5 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,8$	3	$7,3 \pm 1,1$	$3,9 \pm 0,2$	7

während der 2-stündigen Inkubation eine mittlere Angiotensinkonzentration von nahezu 100 % des Ausgangswertes aufrecht erhalten. Nach fünfmaligem Zusatz sind am Ende der 2. Stunde noch 0,67 γ Angiotensin II in 1 ml Bicarbonatpuffer enthalten (67 %); ohne Zusatz sind es nur 0,11 γ (11 %).

Trotz der im Inkubationsmedium konstant gehaltenen Angiotensinkonzentration kann keine mit der Dosis wachsende, signifikante Erhöhung der Corticosteron- und Aldosteronsekretion der Ratten-NNR festgestellt werden (TAB. VII). Auch der Zusatz von Cholesterin zum Inkubationsmedium ändert nichts an diesem Resultat.

Vergleichsversuche mit Bradykinin. In einem relativ breiten Konzentrationsbereich stimuliert Bradykinin weder die Corticosteron- noch die Aldosteronsekretion von isolierten Ratten-Nebennieren (TAB. VIII).

TABELLE VIII

Wirkung von Bradykinin auf Ratten-Nebennieren

Konzentration γ /ml	γ /100 mg NN/2 h		n
	Corticosteron	Aldosteron	
0,02	5,2 $\pm$ 1,5	2,8 $\pm$ 0,2	3
0,2	5,0 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,3	3
2,0	5,4 $\pm$ 1,6	3,8 $\pm$ 0,4	3
Kontrollwerte	5,1 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,3	75

DISKUSSION

Nach den vorliegenden Versuchsergebnissen steigert das synthetische β^{1-24} -Corticotropin die Corticosteronsekretion isolierter Ratten-Nebennieren im gleichen Ausmass wie natürliches ACTH. Auch das von HOFMANN *et al.* (14) synthetisierte Tricosapeptid (Sequenz 1-23) zeigt noch die volle ACTH-Aktivität. Das von LI *et al.* (17) synthetisch gewonnene Nonadecapeptid (Sequenz 1-19) hat nur noch 30-50 % der ACTH-Aktivität und die von uns geprüften kleineren Bruchstücke (Sequenz 1-10 und 11-24) erweisen sich bis zu einer Konzentration von 6,67 γ /ml Bicarbonatpuffer als inaktiv.

Die in Abb. 1 dargestellte Dosis-Wirkungsbeziehung für die Steigerung der Corticosteronsekretion durch ACTH stimmt im Dosenbereich zwischen 60 und 300 mE ACTH/100 mg Ratten-NN mit den von KAPLAN und BARTTER (15) ebenfalls mit Ratten-NN *in vitro* erzielten Werten gut überein.

Die bei einer Konzentration von $0,2 \gamma$ β^{1-24} -Corticotropin pro ml Bicarbonatpuffer secernierte Aldosteronmenge war wohl gegenüber dem Kontrollwert schwach erhöht, doch konnte keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung aufgestellt werden.

Sowohl das Tridecapeptid α -MSH als auch das Octadecapeptid β -MSH zeigten in unseren Versuchen über einen grossen Dosisbereich eine, wenn auch gegenüber ACTH schwache, Wirkung (ca. $1/4000$) auf die Corticosteronsekretion der Ratten-NN. Hierbei erwies sich α -MSH ca. 5mal ($\pm 1,8$) wirksamer als dieselbe Menge β -MSH (ca. 4mal wirksamer auf molarer Basis). STEELMAN und GUILLEMIN (28) sowie SULMAN *et al.* (30) konnten demgegenüber im Sayers-Test nur für α -MSH eine corticotrope Wirkung feststellen.

Die Wirkung einer die Corticosteronsekretion der Ratten-NN bereits deutlich erhöhenden Dosis von β^{1-24} -Corticotropin konnte in unseren Versuchen durch Zusatz einer Dosis von α -MSH-ähnlicher Wirkungsintensität nicht signifikant verändert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Sekretionsanregung beider Hormone für Corticosteron über denselben Mechanismus verläuft.

Durch eine genügend früh vor Versuchsbeginn durchgeführte Hypophysektomie der Versuchstiere sollten die durch Tagesschwankungen und Stress verursachten Aktivitätsunterschiede der NNR ausgeschaltet werden (13, 31). DEAR und GUILLEMIN (9) fanden aber *in vivo* an der Ratte nach Hypophysektomie ein mit der Zeit exponentiell abnehmendes Ansprechen der NNR auf ACTH. Daher stellte sich die Frage, in welcher Zeit eine Reaktivierung der NNR durch ACTH *in vitro* erfolgt. Wir fanden, dass 96 Stunden nach Hypophysektomie die Kontrollwerte für Corticosteron und Aldosteron ca. die Hälfte der Normalwerte betrugen und β^{1-24} -Corticotropin eine wesentlich geringere Corticosteronsekretion bewirkte als bei Nebennieren intakter Ratten. Demnach eignen sich Nebennieren von vor Versuchsbeginn hypophysektomierten Ratten weniger gut für den Saffrantest, als jene von intakten Ratten.

Mit Angiotensin II konnte keine Anregung der Corticosteron- und Aldosteronsekretion nachgewiesen werden, obwohl die Angiotensinkonzentration im Inkubationsmedium konstant gehalten und Cholesterin zugesetzt wurde, um die Steroidsynthese optimal anzuregen (29, 1). KAPLAN und BARTTER (15) gelang es dagegen, mit Rinder-NNR-

Schnitten, unter sonst gleichen Bedingungen eine Steigerung der Aldosteronsekretion nachzuweisen. Das Nicht-Ansprechen auf Angiotensin II könnte demnach eine Ratten-Eigentümlichkeit sein. Dem widerspricht der Befund von MARX *et al.* (19), wonach durch Verabreichung von Angiotensin II (0,4 mg/100 g, s.c.) an Ratten eine Hypertrophie der zona glomerulosa der NNR, dem Ort der Aldosteronproduktion, verursacht wird. Dieser Befund konnte von EILERS und PETERSON (21) nicht bestätigt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass nicht Angiotensin II, sondern Metaboliten davon oder von Angiotensin II liberierte Substanzen die Wirkung auf die Aldosteronsekretion verursachen, die in bestimmten *in vitro*-Systemen nicht zur Verfügung stehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Im *Saffran*-Test wurde festgestellt, dass synthetisches β^{1-24} -Corticotropin 100 % der corticotropen Wirkung von natürlichem ACTH aufweist. α -MSH und β -MSH steigerten ebenfalls die Corticosteronabgabe von Ratten-NN, jedoch in wesentlich geringerem Ausmass als ACTH und bei vergleichsweise ca. 100-facher Dosis. β^{1-10} - und β^{11-24} -Corticotropin, Bradykinin und Angiotensin II stimulierten weder die Corticosteron- noch die Aldosteronsekretion der Ratten-NN *in vitro*. Während der zweistündigen Inkubation wurden ca. 90 % des eingesetzten Angiotensin II inaktiviert. Nebennieren von Ratten, die 96 Stunden vor Versuchsbeginn hypophysektomiert wurden, zeigten *in vitro* gegenüber β^{1-24} -Corticotropin eine weitgehend verminderte Empfindlichkeit.

SUMMARY

The *Saffran* test revealed that synthetic β^{1-24} corticotropin displays 100 % of the corticotropic activity of naturally occurring A.C.T.H. Melanocyte stimulating hormone (α -M.S.H. and β -M.S.H.) also stimulated corticosterone secretion from rat adrenals, although to a far smaller degree than A.C.T.H., the dose required being approximately 100 times that of A.C.T.H. β^{1-10} and β^{11-24} corticotropin, bradykinin, and angiotensin II stimulated neither corticosterone nor aldosterone secretion from rat adrenals *in vitro*. During the two-hour period of incubation approximately 90 % of the angiotensin employed was inactivated. The adrenals of rats which had been hypophysectomised 96 hours previously showed greatly reduced sensitivity to β^{1-24} corticotropin *in vitro*.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med H. J. BEIN, dem ich an dieser Stelle für die Ermöglichung dieser Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und wohlwollende Unterstützung aufrichtig danken möchte.

Besonderer Dank gilt auch Herrn P.D. Dr. med H. BRUNNER für seine unermüdliche Hilfe, die er mir stets gewährte.

LITERATUR

1. — BARLOW, J. J., HOLUB, D. A. und JAILER, J. W. Pathways of Aldosterone Biosynthesis. *Clin. Res.*, 1960, 8, 373.
2. — BOISSONNAS, R. A., GUTTMANN, St. und JAQUENOUD, P. A. Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phényl-alanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta*, 1960, 43, 1349-1358.
3. — BRUNNER, H. und REGOLI, D. The enzymatic degradation of various angiotensin II derivatives by serum, plasma or kidney homogenate. *Experientia*, 1962, 18, 504-506.
4. — BURN, J. W., FINNEY, D. J. und GOODWIN, L. G. *Biological Standardization*. Oxford University Press, 1952, 272-279.
5. — BUSH, J. E. Methods of Paper Chromatography of Steroids Applicable to the Study of Steroids in Mammalian Blood and Tissues. *Biochem. J.*, 1952, 50, 370-378.
6. — BUSH, J. E. Species differences and other factors influencing adrenocortical secretion. *CIBA Foundation Colloquia on Endocrinology*, 1953, 7, 210-228.
7. — DAVIS, J. O. Critical evaluation of the role of receptors in the control of aldosterone secretion and sodium excretion. *Progr. in Cardiovascular Diseases* 4, 1961, No. 1, 27-46.
8. — DAVIS, J. O., CARPENTER, Ch. J. und AYERS, C. R. Relation of Renin and Angiotensin II to the Control of Aldosterone Secretion. *Circulation Res.*, 1962, 11, 171-181.
9. — DEAR, W. und GUILLEMIN, R. Adrenal sensitivity to ACTH as a function of time after hypothalamic lesion and after hypophysectomy. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1960, 103, 356-358.
10. — DE ROOS, R. und DE ROOS, C. C. Angiotensin II. Its Effects on corticoid Production by Chicken Adrenals *in vitro*. *Science*, 1963, 141, 1284.
11. — EILERS, E. A. und PETERSON, R. E. Aldosterone secretion in the rat. Paper read at C.I.O.M.S. Symposium on Aldosterone. *Prague Czechoslovakia*, 251-264 (Aug. 24, 1963).
12. — GLAZ, E. und SUGAR, K. The Effect of Synthetic Angiotensin II on Synthesis of Aldosterone by the Adrenals. *J. Endocrin.*, 1962, 24, 299-302.

13. — GUILLEMIN, R., CLAYTON, G. W., SMITH, J. D. und LIPSCOMB, H. S. Measurement of free Corticosteroids in Rat Plasma. *Endocrinology*, 1958, 63, 349-358.
14. — HOFMANN, K., YASJIMA, H., YANAIHARA, N., LIU, T. Y. und LANDE, S. Studies on Polypeptides XIII. The Synthesis of a Tricosapeptide Possessing Essentially the Full Biological Activity of Natural ACTH. *J. Amer. chem. Soc.*, 1961, 83, 487-489.
15. — KAPLAN, N. M. und BARTTER, F. C. The effect of ACTH, Renin, Angiotensin II and Various Precursors on Biosynthesis of Aldosterone by Adrenal Slices. *J. clin. Invest.*, 1962, 41, 715-724.
16. — KAPPELER, H. und SCHWYZER, R. Die Synthese eines Tetracosapeptides mit der Aminosäuresequenz eines hochaktiven Abbauproduktes des β -Corticotropins (ACTH) aus Schweinehypophysen. *Helv. Chim. Acta*, 1961, 44, 1136-1141.
17. — LI, C. H., MEIENHOFER, J., SCHNABEL, E., CHUNG, D., LO, P. B. und RAMACHANDRAN, J. The Synthesis of a Nonadecapeptide Possessing Adrenocorticotropic and Melanotropic Activities. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, 82, 5760-5762.
18. — LORD, E. The Use of Range in Place of Standard Deviation in the *t*-Test. *Biometrika*, 1947, 34, 41-67.
19. — MARX, A. J., WENDLER, D. H., MOWLES, T. F. und SHEPPARD, H. Effects of the Chronic Administration of Synthetic Angiotensin in Rats. *Life Sciences*, 1963, 2, 16-21.
20. — MOON, H. D. (Editor). *The Adrenal Cortex*. P. B. Hoeber Inc., New York, 1961.
21. — NELSON, D. H. und HUME, D. M. Corticoid secretion in the adrenal venous blood of the hypophysectomized dog as an assay for ACTH. *Endocrinology*, 1955, 57, 184-192.
22. — SAFFRAN, M. und SCHALLY, A. V. *In vitro* Bioassay of Corticotropin, Modification and Statistical Treatment. *Endocrinology*, 1955, 56, 523-532.
23. — SCHWYZER, R. und KAPPELER, H. Synthese von Zwischenprodukten für den Aufbau corticotrop wirksamer Polypeptide III. Das Decapeptid H. Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-OH und einige seiner Derivate. *Helv. Chim. Acta*, 1961, 44, 1991-2002.
24. — SCHWYZER, R. und KAPPELER, H. Synthese eines Tetracosapeptides mit hoher corticotroper Wirksamkeit: β^{1-24} -Corticotropin. *Helv. Chim. Acta*, 1963, 46, 1550-1572.

25. — SCHWYZER, R., COSTOPANAGIOTIS, A. und SIEBER, P. Zwei Synthesen des α -Melanotropins (α -MSH) mit Hilfe leicht entfernbarer Schutzgruppen. *Helv. Chim. Acta*, 1963, 46, 870-889.
26. — SCHWYZER, R., ISELIN, B., KAPPELER, H., RINIKER, B., RITTEL, W. und ZUBER, H. Synthese hochwirksamer Oktapeptide mit der vermutlichen Aminosäuresequenz des noch unbekannten Hypertensins II aus Rinderserum. *Helv. Chim. Acta*, 1958, 41, 1287-1295.
27. — SCHWYZER, R., ISELIN, B., KAPPELER, H., RINIKER, B., RITTEL, W. und ZUBER, H. Die Synthese des β -Melanotropins (β -MSH) mit der Aminosäuresequenz des bovinen Hormons. *Helv. Chim. Acta*, 1963, 46, 1975-1996.
28. — STEELMAN, S. L. und GUILLEMIN, R. Adrenocorticotropic Activity of α -Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1959, 101, 600-601.
29. — STONE, D. und HECHTER, O. Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals. The site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch. Biochem.*, 1954, 51, 457-469.
30. — SULMAN, F. G., ECKSTEIN, Z. B., KHAZAN, N. und PFEIFER, Y. Separation of ACTH and MSH Fractions from Pituitaries of Different Species. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1963, 112, 202-205.
31. — UNGAR, F. und HALBERG, F. *In vitro* Exploration of a Circadian Rhythm in Adrenocorticotropic Activity of C mouse Hypophysis. *Experientia*, 1963, 19, 158-160.
32. — WEISSBECKER, L. Klinik der Nebenniereninsuffizienz und ihre Grundlagen. *Ferd. Enke Stuttgart*, 1954, 105.
33. — WEISZ, P. und KEMENY, V. Aldosteron production of compensated hypertrophic adrenals. *Experientia*, 1963, 19, 540-541.
34. — ZAFFARONI, A. und BURTON, R. B. Identification of Corticosteroids of Beef Adrenal Extract by Paper Chromatography. *J. biol. Chem.*, 1951, 193, 749-767.

DIE VORLIEGENDE ARBEIT ENTSTAND UNTER LEITUNG VON
HERRN PROF. DR. MED. H. J. BEIN

Herrn Prof. BEIN möchte ich an dieser Stelle für die Ermöglichung dieser Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und wohlwollende Unterstützung aufrichtigst danken

Mein herzlicher Dank gilt besonders auch Herrn P. D. Dr. med. H. BRUNNER für die unermüdliche Hilfe, die er mir stets gewährte

CURRICULUM VITAE

Am 11.9.1934 wurde ich, Elfriede Maria GRÖGER-KORBER in Wien/Oesterreich geboren.

In Oesterreich besuchte ich von 1940 bis 1944 die Primarschule, dann das Realgymnasium, das ich mit der Matura im Juli 1953 mit dem Kalkül „reif mit Auszeichnung“ abschloss.

Anschliessend begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität in Wien, legte ca. 3 Jahre später meine vor-klinischen Examina ab und erhielt im Juli 1959 das Absolutorium. Im Jahre 1961 setzte ich mein Studium an der Universität in Basel fort und erwarb im Herbst 1963 das eidgenössische Aerztediplom.

